

PATENTSCHRIFT

(12)

(21) Anmeldenummer: 405/94

(51) Int.Cl.⁶ : C12P 17/18

(22) Anmeldetag: 25. 2.1994

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 8.1995

(45) Ausgabetag: 25. 3.1996

(73) Patentinhaber:

FERMIC, S.A. DE C.V.
56100 TEXCOCO (MX).

(72) Erfinder:

TISSELLI QUALTIERI EUGENIO
MEXICO CITY (MX).

(54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG UND REINIGUNG VON ALKALIMETALLSALZEN DER CLAVULANSÄURE

(57) Alkalimetallsalze der Clavulansäure werden durch ein Verfahren gewonnen, bei dem eine Fermentationsbrühe von *Streptomyces Clavuligerus* einem Koagulationsschritt, einer Ultrafiltration, einem Entfärbungsschritt, einer Einengung durch reverse Osmose, einer nochmaligen Entfärbung unterworfen, mit einer Alkalimetallsalzlösung versetzt und das entstehende Alkalimetallsalz mit Hilfe organischer Lösungsmittel ausgefällt wird.

Das neue Verfahren ist weniger aufwendig als die bekannten Verfahren und führt zu reineren Produkten in besserer Ausbeute.

AT 400 846 B

PTO 99-0185

S.T.I.C. Translations Branch

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Gewinnung von Clavulansäure, bei welchem diese in Form ihrer Alkalimetallsalze, insbesondere des Kaliumsalzes, direkt aus der Fermentationsbrühe erhalten wird.

Clavulansäure, die auch bekannt ist als (2R,5R,Z)-3-(2-Hydroxyethyliden)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo-
5 2,3,0-heptan-2-carbonsäure, ist ein natürlich vorkommendes Breitbandantibiotikum mittlerer Wirksamkeit und wurde zuerst aus Stämmen von Streptomyces Clavuligerus isoliert (GB-PS 1 508 977).

Die Bedeutung der Clavulansäure liegt nicht so sehr in ihrer antibiotischen Wirksamkeit, sondern in ihrer Fähigkeit, beta-Lactamase zu inhibieren und dadurch die Wirksamkeit von Penicillinen und Cephalosporinen gegen viele beta-Lactamase-produzierende Bakterien zu verstärken.

10 In unserer Zeit findet die Clavulansäure ihre Anwendung in der Humantherapie in Kombination mit Penicillinen, wie Amoxicillin (Augmentin[®], Stacillin[®]) und Ticarcillin (Betabactyl[®], Timentin[®]).

Trotz der Tatsache, daß verschiedene Fraktionierverfahren zur Reinigung der Clavulansäure beschrieben wurden, bleibt dennoch ihre Abtrennung in reiner Form aus den komplexen Mischungen der sie begleitenden Produkte ein Ziel, das schwer zu erreichen ist. Tatsache ist, daß die Clavulansäure in den
15 Fermentationsbrühen von Streptomyces Clavuligerus gemeinsam mit einer Anzahl unerwünschter Komponenten vorliegt, wie Proteinen, Enzymen und anderen beta-Lactam-Antibiotika, insbesondere verschiedenen beta-Lactam-Carbonsäuren, die ein ähnliches chemisch-physikalisches Verhalten zeigen.

Bis jetzt wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, die Clavulansäure in hochreiner Form zu isolieren, was insbesondere über ihre Salzbildung erfolgte, wie über das Lithiumsalz (GB-PS 1 543 563) und
20 das tert.-Butylaminsalz (US-PS 4 647 659).

Alle diese bekannten Methoden haben Nachteile, da sie im allgemeinen nur niedrige Ausbeuten oder Produkte mit unbefriedigender Reinheit liefern und oft sehr mühsam sind. Außerdem erlauben diese Verfahren keine direkte Herstellung des Kaliumsalzes der Clavulansäure, das einen Bestandteil verschiedener
25 im Handel erhältlicher therapeutischer Zusammensetzungen ist, da dessen Herstellung in reiner Form die Umwandlung des Lithiumsalzes oder des tert.-Butylaminsalzes mit Hilfe zusätzlicher Stufen des Ionenersatzes erfordert.

Es wurde nun ein neues, überraschend vorteilhaftes Gewinnungs- und Reineigungsverfahren gefunden, das die Herstellung von Clavulansäure aus den Fermentationsbrühen von Streptomyces Clavuligerus in Form hochreiner Alkalimetallsalze gestattet.

30 Das vorliegende Verfahren zur Herstellung hochreiner Alkalimetallsalze der Clavulansäure umfaßt folgende Schritte:

A) einen Koagulationsschritt, der durch Zusatz eines Flockungsmittels aus der Gruppe Calciumchlorid, Kaliumferrocyanid, wasserlösliche kationische Polymere und organische Polyelektrolyte zu einer Fermentationsbrühe von Streptomyces Clavuligerus bei einer Temperatur von 0°C bis +10°C und bei einem
35 pH-Wert von 4,0 - 4,5 vorgenommen wird;

B) Ultrafiltration der oben erhaltenen, geklärten Fermentationsbrühe von Streptomyces Clavuligerus, die auf einer Temperatur zwischen 0°C und +10°C und bei einem pH-Wert zwischen 6,0 und 6,5 gehalten wird, durch eine Ultrafiltrationsmembran, die einen Cut-off zwischen 30.000 und 100.000 Dalton hat;

40 C) Entfärbung des oben erhaltenen Ultrafiltrats durch Laufenlassen desselben durch eine Säule mit einem polymeren Acrylesterharz bei einer Temperatur von 0°C bis +10°C;

D) Einengung der flüssigen Phase aus Stufe C) mit Hilfe der reversen Osmose durch eine Membran, die einen Cut-off von 750 bis 500 Dalton hat, bei einer Temperatur von 0°C bis +10°C und einem pH-Wert von 6,0 bis 6,5;

45 E) Entfärbung der eingengten Flüssigkeit mit säuregewaschener, dampfaktivierter Kohle bei einem pH-Wert von 6,0 bis 6,5 und einer Temperatur von 0°C bis +10°C;

F) Salzbildung der Clavulansäure durch Zusatz einer wässrigen Lösung eines Alkalimetallsalzes zu der oben erhaltenen angereicherten wässrigen Lösung;

50 G) Ausfällung des Alkalimetallsalzes der Clavulansäure aus der oben erhaltenen wässrigen Lösung durch Zusatz eines niedrigen Alkohols aus der Gruppe Methanol und Ethanol und anschließenden Zusatz eines aus der Gruppe Isopropanol und Aceton ausgewählten Lösungsmittels zu der dort erhaltenen hydroalkoholischen Phase bei einer Temperatur von +5°C bis +15°C.

Das vorliegende Verfahren stellt eine besondere Auswahl von Reinigungsschritten dar, die es gestatten, Clavulansäure-Alkalimetallsalze der Qualität USP XXII zu erhalten, wobei das Verfahren einfacher, praktischer und zeitsparender im Vergleich zu den Reinigungsverfahren des Standes der Technik ist.

55 Die Verwendung ausgewählter Flockungsmittel, die Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen mit einem speziellen Cut-off und die Auswahl spezieller Entfärbungsmaterialien gestatten es, eine außerordentlich gereinigte Lösung zu erhalten, die für den anschließenden Ausfällungsschritt besonders geeignet ist.

Soweit bekannt ist, wurden Ultrafiltrationsmembranen mit einem Cut-off von 30.000 bis 100.000 bisher noch nie zur Reinigung von Clavulansäure verwendet.

Im Hinblick auf den Ausfällungsschritt sei betont, daß dessen Wirksamkeit bezüglich der Trennung von Clavulansäure-Alkalimetallsalzen von den unerwünschten Verunreinigungen mit der Auswahl spezieller Mischungen von Lösungsmitteln zusammenhängt, die eine Ausfällung der genannten Salze in einer sehr reinen Form gestatten, wobei sie die gummiartigen Nebenprodukte in Lösung halten.

Die derart ausgefällten Alkalimetallsalze der Clavulansäure sind besonders gut kristallisierte, weiße Feststoffe.

Die vorliegende Reinigungsmethode wurde mit Erfolg insbesondere bei Fermentationsbrühen angewendet, die von dem Stamm *Streptomyces Clavuligerus* var. FAC, der in den Beispielen 2 und 3 beschrieben ist, erhalten wurden.

Ausgehend von *Streptomyces Clavuligerus* Type Stamm ATCC 27064 und unter Einsatz bekannter Genmanipulationsverfahren konnte der transformierte Stamm *Streptomyces Clavuligerus* var. FAC erhalten werden, der eine unerwartet stärkere Produktionskapazität im Vergleich zum Originalstamm besitzt (siehe Beispiel 2).

Die Produktion von Clavulansäure aus *Streptomyces Clavuligerus* var. FAC erfolgt durch Züchtung desselben in Gegenwart von assimilierbaren Quellen von Kohlenstoff, Stickstoff und Mineralsalzen sowie gegebenenfalls von Triglyceriden. Vorzugsweise wird die Züchtung unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur von +20°C bis +37°C, insbesondere von +20°C bis +30°C, unter Rühren vorgenommen.

Bevorzugte Proteinquellen sind Maismehl, Erdnußmehl, Sojabohnenmehl, Baumwollsaamenmehl; besonders bevorzugt ist ein spezielles entfettetes Baumwollsaamenmehl. Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Dextrin, Dextrose und Maisstärke. Die Menge der Proteinquellen, Kohlenstoffquellen und Triglyceride in den Kulturmedien beträgt im allgemeinen 1 % bis 10 %, in der Regel 2 % bis 5 %.

Dem Kulturmedium werden meist Mineralsalze zugesetzt, insbesondere Kalium-, Calcium-, Natriumsalze, wie etwa Carbonate und Phosphate.

Spurenelemente in Form anorganischer Salze von Co, Fe, Mg, Ni, Zn und Cu (Sulfate und Chloride) können den Kulturmedien ebenfalls zugesetzt werden.

Es kann erforderlichenfalls auch ein schaumverhinderndes Mittel zugesetzt werden, um eine übermäßige Schaumbildung zu vermeiden.

Vorzugsweise wird in der Fermentationsstufe *Streptomyces Clavuligerus* FAC unter aeroben Bedingungen unter Rühren bei einer Temperatur von +24°C bis +27°C und einem pH-Wert von 6,8 bis 7,0 in Gegenwart eines Mediums gezüchtet, das eine Proteinquelle aus der Gruppe Sojabohnenmehl, Erdnußmehl und Baumwollsaamenmehl; eine Kohlenstoffquelle aus der Gruppe Dextrin, Dextrose und Maisstärke; Triglyceride und Spurenelemente aus der Gruppe der anorganischen Salze von Fe, Mg, Zn und Cu enthält.

Während der Fermentation wird der pH-Wert durch Zusatz von Alkali kontrolliert und die Kohlenstoffquelle wird zur Verbesserung der Produktion kontinuierlich zugeführt.

Der Fermentationsstufe gehen im allgemeinen einige Wachstumsstufen voran. Insbesondere wird die Züchtung von *Streptomyces Clavuligerus* var. FAC in den folgenden Schritten durchgeführt:

- a) Errichtung einer Sporensuspension von *Streptomyces Clavuligerus* var. FAC;
- b) Inokulierung der Kultur in einem geeigneten Samentank;
- c) Übertragung der reifen Samentankkultur in einen belüfteten und gerührten Fermenter, in welchem die Kultur der oben beschriebenen Fermentationsstufe ausgesetzt wird.

Die Sporenzüchtung wird vorzugsweise durch Züchtung von *Streptomyces Clavuligerus* var. FAC auf einem festen Agarmedium mit einem Gehalt an einer Kohlenstoffquelle (Dextrin oder Dextrose), einem Calciumsalz als Mineralsalz und Co- und Fe-Salzen als Spurenelemente hergestellt; die Kolonien mit bester Produktion werden dann selektiert, nachdem zuerst in einem vegetativen Medium, das eine Proteinquelle aus der Gruppe Maismehl und Erdnußmehl, Maisstärke als Kohlenstoffquelle und Kaliumsalz als Mineralsalz enthält, gezüchtet und dann in einem Fermentationsmedium, das Sojabohnenmehl oder Erdnußmehl als Proteinquelle, Dextrose als Kohlenstoffquelle, ein Kaliumsalz als Mineralsalz und Ni- und Co-Salze als Spurenelemente enthält, weitergezüchtet worden war. Die am besten produzierenden Kolonien werden dann auf einem festen Medium vermehrt.

Die Züchtung in dem Samentank wird in einem Medium durchgeführt, das Sojabohnenmehl, Baumwollsaamenmehl und Maismehl als Proteinquelle, Dextrose oder Dextrin als Kohlenstoffquelle und ein Natriumsalz als Mineralsalz enthält.

Alle oben genannten Züchtungsschritte werden bei Temperaturen von +20°C bis +37°C, vorzugsweise von +25°C bis +30°C, unter aeroben Bedingungen und, wenn im flüssigen Medium gearbeitet wird, unter Rühren durchgeführt.

In der Regel hat die zu reinigende Fermentationsbrühe einen fast neutralen oder schwach sauren pH-Wert, der meist zwischen 6,0 und 7,0 liegt, und hat eine Stärke von 3,5 g/l bis 4,5 g/l, vorzugsweise von 4,0 g/l bis 4,5 g/l, ausgedrückt als Gramm Clavulansäure in jedem Liter Brühe.

Die Stärke wurde durch Bestimmung des Clavulansäuregehalts durch HPLC gemäß US XXII (S. 316)

5 festgestellt.

Nach einem bevorzugten Verfahren werden die Stufen A bis E bei einer Temperatur von +2°C bis +5°C durchgeführt.

10 Vor dem Ultrafiltrationsschritt wird die Fermentationsbrühe durch Denaturieren und Koagulation der darin enthaltenen Proteine geklärt. Der Koagulationsschritt ermöglicht ein Zusammenballen der fein verteilten, in der Fermentationsbrühe suspendierten Feststoffteilchen zu Klumpen und verursacht auch eine Abtrennung der löslichen Polypeptide.

15 Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Koagulationsschrittes wird eine hoch gereinigte Fermentationsbrühe erhalten. Das Koagulationsmittel wird im allgemeinen in Mengen von 0,5 % bis 2 % (Gew./Vol.) in bezug auf das Volumen der Fermentationsbrühe eingesetzt. Ein bevorzugtes Koagulationsmittel ist ein koagulierend wirkendes, wasserlösliches kationisches Polymer, insbesondere ein flüssiges kationisches Flockungsmittel mit einem spezifischen Gewicht bei 20°C von 1,14 bis 1,18 kg/dm³, einem Titer von 29 bis 31%, einer Brookfield-Viskosität bei 25°C von 200 bis 500 cps, einem pH-Wert von 5 bis 8, einer völligen Löslichkeit in Wasser und einem Gefrierpunkt von -18 (+/-3) °C, das in der Regel in einer Menge von 1% eingesetzt wird.

20 Das Polyelektrolyt ist beispielsweise ein wasserlösliches kationisches Polymer mit einem spezifischen Gewicht bei 20°C von 1,14 bis 1,18 kg/dm³, einem Titer von 29 bis 31%, einer Brookfield-Viskosität bei 25°C von 200 bis 500 cps, einem pH-Wert von 5 bis 8, einer völligen Löslichkeit in Wasser und einem Gefrierpunkt von -18 (+/-3) °C.

25 Der pH-Wert während des Koagulationsschrittes wird durch Zusatz einer organischen Säure, wie Propionsäure, Essigsäure oder Zitronensäure, eingestellt. Der bevorzugte pH-Wert liegt bei 4,2.

Nach dem Koagulationsschritt wird das ausgeflockte Material dann durch übliche Verfahren, wie beispielsweise durch Filtration, abgetrennt.

30 Der Ultrafiltrationsschritt gemäß dem vorliegenden Verfahren ist zur Reinigung der Fermentationsbrühe besonders wirkungsvoll. Bei der Ultrafiltration werden nicht nur die suspendierten Feststoffe abgetrennt, sondern, was viel wichtiger ist, auch einige wasserlösliche Moleküle mit hohen Molekulargewichten (Zucker und lösliche Peptide, die als Nährstoffe in den Kulturdemen von *Streptomyces Clavuligerus* anwesend waren; Mycelproteine), die bei dem anschließenden Reinigungsschritt störend wirken könnten.

35 Während der Ultrafiltration wird der pH-Wert durch Zusatz einer Base, in der Regel einer wässrigen Lösung von Natriumhydroxid, welche vorher auf die ausgewählte Temperatur abgekühlt worden war, auf den vorbestimmten Werten gehalten.

Für das erfindungsgemäße Verfahren besonders gut verwendbare Ultrafiltrationsmembranen haben einen Cut-off von 30.000 - 40.000 und werden aus Celluloseacetat oder Polysulfon hergestellt, wobei das letztgenannte bevorzugt ist. Polysulfonmembranen, die einen Cut-off von 35.000 Dalton aufweisen, sind besonders bevorzugt.

40 Gemäß dem vorliegenden Verfahren wird die Ultrafiltration nach der Diafiltrationstechnik vorgenommen, einem speziellen Ultrafiltrationsverfahren, bei welchem die permeablen Feststoffe durch Zusatz von Wasser zu dem Retentat noch weiter extrahiert werden. Insbesondere wird zuerst ein Teil der Flüssigkeit (etwa 1/3 bis 2/3) durch die ausgewählte Membran ultrafiltriert, worauf der verbleibende Teil durch die selbe Membran diafiltriert wird, indem dem Retentat entionisiertes Wasser bei gleicher Filtrationsrate zugesetzt wird.

45 Die Diafiltration wird in der Regel abgebrochen, wenn der Verdünnungsfaktor bei 1:1,2 bis 1:2,4 liegt, was, ausgehend von einer Fermentationsbrühe mit einer Stärke von 4,0 bis 4,5, einer Stärke der diafiltrierten Flüssigkeit von etwa 1,2 g/l bis 1,5 g/l entspricht.

50 Die reverse Osmose ist ein gut bekanntes Verfahren (das beispielsweise zur Entsalzung von Wasser verwendet wird). Sie wird hier als eine milde und selektive Einengungsmethode verwendet, um die Konzentration der Clavulansäure in der wässrigen Phase zu erhöhen und den günstigsten Wert für den anschließenden Fällungsschritt zu erreichen. Während der reversen Osmose wird das Wasser gezwungen, aus der Lösung heraus, durch eine semipermeable Membran hindurchzutreten, durch welche gelöste Stoffe nicht hindurchgelangen, wobei auf die Oberfläche der wässrigen Lösung ein entsprechender Druck

55 aufgebracht wird. Bei dem vorliegenden Verfahren werden semipermeable Membranen verwendet, durch die die Clavulansäure nicht hindurch gelassen wird. Es kann eine Reihe von verschiedenen Materialien verwendet werden, sofern nur ihr Cut-off innerhalb des ausgewählten Bereichs liegt.

Vorzugsweise werden Membranen aus Celluloseacetat mit einem Cut-off von 500 Dalton verwendet.

Die reverse Osmose wird im allgemeinen dann abgebrochen, wenn die konzentrierte Lösung die gewünschte Clavulansäurekonzentration für den nachfolgenden Ausfällungsschritt erreicht hat, das heißt eine Stärke von 10 g/l bis 30 g/l, vorzugsweise von 15 g/l bis 20 g/l, aufweist.

Drücke von 30 bar bis 40 bar (entsprechend $3 \cdot 10^6$ Pa bis $4 \cdot 10^6$ Pa) sind im allgemeinen erforderlich.

Das in Stufe C verwendete Acrylesterharz ist vorzugsweise ein Harz mit einem Porenvolumen von 55 %, einem mittleren Porendurchmesser von $80 \cdot 10^{-4}$ μ m und einer Maschengröße entsprechend Öffnungen von 1,27 bis 0,508 mm (20- 50 Öffnungen alle 25,4mm), z.B. einen Acrylester-Polymeradsorptionsmittel, das ein Porenvolumen von 55%, eine echte Naßdichte von 1,05 g/ml, eine Oberflächenfläche von 450 m²/g, einen mittleren Porendurchmesser von $80 \cdot 10^{-4}$ μ , eine Skelettdichte von 1,24 g/ml, eine Maschengröße entsprechend Öffnungen von 1,27 bis 0,508 mm und einen schwach polaren Charakter aufweist.

Die in Stufe E verwendete aktivierte Kohle ist vorzugsweise eine Aktivkohle, von der 10 % bis 15 % eine Teilchengröße von mehr als 74 μ m und 70 % - 75 % eine Teilchengröße von mehr als 10 μ m aufweisen, die Molasse-Entfärbungszahl unter 200 liegt und die Oberfläche mehr als 1000 m²/g beträgt, die insbesondere eine Molasse-Entfärbungszahl von 175 und eine Oberfläche von 1150 m²/g aufweist, wie etwa ein säuregewaschener, dampfaktivierter Kohlenstoff, der eine Methylenblau-Adsorption von mindestens 20 g/100g, einen maximalen Feuchtigkeitsgehalt bei Verpacken von 10%, einen maximalen Aschengehalt von 8%, ein säurelöslichen Inhalt von maximal 1%, einen Calciumgehalt von maximal 200 ppm, einen Eisengehalt von maximal 200 ppm, einen Aschegehalt von 5%, einen wasserlöslichen Inhalt von 0,3%, einen pH-Wert des Wasserextrakts von 6 bis 8, eine Packungsschüttdichte von 0,290 g/ml, eine Partikelgröße größer als 74 μ m bei 10-15% und eine Partikelgröße größer als 10 μ m bei 70-75% aufweist.

Die Alkalimetallsalze können entweder anorganische oder organische Salze von Alkalimetallen, wie Natrium, Kalium und Lithium, sein. Unter den anorganischen Salzen sind es die Carbonate und Bicarbonate, die verwendet werden können. Von den organischen Salzen können die Propionate, Acetate und die 2-Ethylhexanoate verwendet werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können insbesondere Kaliumsalze, vorzugsweise Kaliumacetat, verwendet werden, worauf das Kaliumclavulanat in besonders reiner Form ausgefällt wird. Das Alkalimetallsalz wird in einer Menge zugesetzt, die zumindest zur Salzbildung der Clavulansäure ausreicht, vorzugsweise in Mengen von 1,3 bis 2,0 Äquivalente in bezug auf die entsprechende Säure.

Im allgemeinen ist es zur Erzielung einer größtmöglichen Ausbeute an Clavulansäure bevorzugt, die Konzentration des Alkalimetallsalzes der Clavulansäure in der wässrigen Lösung vor dem Zusatz des niedrigeren Alkohols auf Werte zwischen 10 g/l und 30 g/l, vorzugsweise von 15 g/l bis 20 g/l, insbesondere 17 g/l, ausgedrückt als Stärke der Clavulansäure, einzustellen.

Um eine übermäßige Verdünnung der wässrigen entfärbten Lösungen (aus Stufe E) zu vermeiden, werden die organischen und anorganischen Alkalimetallsalze in der Regel in Form von sehr konzentrierten, sogar gesättigten Lösungen zugesetzt. Beispielsweise wird das Alkalimetallsalz, wenn Kaliumacetat als solches verwendet wird und die angereicherte wässrige Lösung Clavulansäure in einer Menge von 15 g/l bis 20 g/l enthält, in Form einer gesättigten Lösung zugesetzt, und die Menge des Alkalimetallsalzes wird durch Einstellung des pH-Wertes zwischen 8,0 und 8,5 reguliert.

Die Menge des Methanols ebenso wie die des Isopropanols oder Acetons, die während des Ausfällungsschrittes verwendet wird, wird so eingestellt, daß Menge und Qualität des zu gewinnenden Alkalimetallsalzes der Clavulansäure optimiert werden. Vorzugsweise ist Methanol der verwendete niedrige Alkohol.

In der Regel werden 0,5 bis 1,5 Volumteile Methanol für jeden Volumteil der angereicherten wässrigen Lösung zugesetzt, während Isopropanol in Mengen eingesetzt wird, die im Bereich von 0,5 bis 3 Volumteilen liegen, und Aceton in Mengen von 15 bis 50 Volumteilen, bezogen auf die hydroalkoholische Phase, verwendet wird.

Wenn die angereicherte Lösung das Kaliumsalz der Clavulansäure in einer Menge von 15 g/l bis 20 g/l enthält, wird vorzugsweise 1 Volumteil Methanol verwendet, ist das organische Lösungsmittel Aceton und wird in einer Menge von 40 Volumteilen, bezogen auf die hydroalkoholische Phase, eingesetzt.

Die bevorzugte Temperatur des Ausfällungsschrittes beträgt +5 °C.

Die ausgefällten Alkalimetallclavulanate können auf übliche Weise abgetrennt werden, wie durch Filtration, und können dann im Vakuum (z.B. dem Vakuum, das durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt wird) bei Raumtemperatur getrocknet werden.

Das vorliegende Verfahren liefert die Alkalimetallsalze der Clavulansäure in kristalliner und hochreiner Form und in sehr guten Ausbeuten.

Im Vergleich zu den bisher bekannten Verfahren ist das vorliegende Verfahren insoweit sehr vorteilhaft, als es mit einer niedrigen Anzahl von Verfahrensschritten, ohne Zwischenisolierung der Clavulansäure oder

ihrer Salze durchgeführt werden kann. Außerdem wird das vorliegende Reinigungsverfahren mit relativ kleinen Volumsmengen an Lösungsmitteln und Wasser durchgeführt, wodurch der Einsatz von Konzentrationssäulen, der äußerst unpraktisch ist, vermieden wird.

Die vorliegende Erfindung wird anhand des folgenden, nicht einschränkenden Beispiels erläutert.

5

Beispiel

150 Liter Fermentationsbrühe von *Streptomyces Clavuligerus* (Stärke 4,2 g/l, einer Aktivität von 630 g äquivalent) werden in einem ummantelten Reaktor auf +5 °C abgekühlt, der pH-Wert wird mit reiner Essigsäure auf 4,2 eingestellt und die Masse wird mit 1 % eines flüssigen kationischen Flockungsmittels, das ein spezifisches Gewicht bei 20 °C von 1,14 bis 1,18 kg/dm³, einem Titer von 29 bis 31%, einer Brookfield-Viskosität bei 25 °C von 200 bis 500 cps, einem pH-Wert von 5 bis 8, einer völligen Löslichkeit in Wasser, einem Gefrierpunkt von -18 (+/-3) °C, welches von PRODECO (Italien) unter dem Handelsnamen Prodefloc[®] verkauft wird, versetzt. Nach 30 min wird das Rührwerk abgestellt und die Flocken durch

15 Filtrieren durch ein Sieb mit Öffnungen von 0,127mm abgetrennt.
Die filtrierte Flüssigkeit wird zum Ultrafiltrationsverfahren gebracht, bei welchem eine Polysulfon-Membran mit einem Cut-off von 35.000 Dalton verwendet wird.

Sobald etwa die Hälfte des Volumens filtriert ist, beginnt die Diafiltration durch Zusatz von entionisiertem Wasser bei der gleichen Filtrationsgeschwindigkeit. Die Filtration wird abgebrochen, sobald der Verdünnungsfaktor zwischen 1:2,1 bis 1:2,4 liegt und 330 bis 360 Liter Ultrafiltrat mit einer Stärke von 1,5 g/l gewonnen sind (Gesamtaktivität 495 bis 500 Gramm in dem Ultrafiltrat, entsprechend 78 % Ausbeute Aktivität/Aktivität der filtrierten Brühe).

Es werden etwa 60 Liter Retentat gewonnen, das Mycelproteine und Nebenprodukte enthält.

25 Während dieses Verfahrens wird die Temperatur auf +5 °C und der pH-Wert mit 5 %-igem Natriumhydroxid, das auf +5 °C gekühlt ist, auf 6 bis 6,5 gehalten.

Die Ultrafiltrationsbrühe, die auf +5 °C gekühlt wird, wird durch eine Entfärbungssäule laufen gelassen, die 8 kg eines Acrylester-Polymeradsorptionsmittels enthält, das ein Porenvolumen von 55%, eine echte Naßdichte von 1,05 g/ml, eine Oberflächenfläche von 450 m²/g, einen mittleren Porendurchmesser von 80 · 10⁻⁸ µ, eine Skelettdichte von 1,24 g/ml, eine Maschenweite entsprechend Öffnungen von 1,27 bis 0,508 mm und einen schwach polaren Charakter aufweist, welches von der Rohm und Haas Company unter der Handelsmarke AMBERLITE XAD7[®] verkauft wird, und wird unmittelbar darauf zur reversen Osmose geschickt.

Während dieses Verfahrens wird die Temperatur auf +2 °C bis +5 °C und der pH-Wert auf 6,2 gehalten.

35 Die verwendete Einrichtung ist ein DDS Modell RO 30 (Handelsmarke der Danske Sukkerfabrikker, Dänemark) mit Celluloseacetat-Membranen mit einem Cut-off von 500 Dalton.

Die Einengung wird verfolgt, bis der Druck auf über 35 bar gestiegen und die Strömung auf ein Fünftel der Originalströmung herabgesetzt ist.

Es werden 20 l der eingengten Lösung mit einer Konzentration von 17,5 g/l erhalten; das entspricht 40 350 g Aktivität (Ausbeute 70 % Aktivität/Aktivität der filtrierten Brühe; Gesamtausbeute 55 %).

Die angereicherte Lösung wird bei +3 °C und einem pH-Wert von 6 in drei Stufen mit 1,5 kg Entfärbungskohle einem säuregewaschenen, dampfaktivierten Kohlenstoff, der eine Methylenblau-Adsorption von mindestens 20 g/100g, einen maximalen Feuchtigkeitsgehalt bei Verpacken von 10%, einen maximalen Aschengehalt von 8%, einen säurelöslichen Inhalt von maximal 1%, einen Calciumgehalt von maximal 200 ppm, einen Eisengehalt von maximal 200 ppm, einen Aschengehalt von 5%, einen wasserlöslichen Inhalt von 0,3%, einen pH-Wert des Wasserextrakts von 6 bis 8, eine Packungsgesamtdichte von 0,290 g/ml, eine Partikelgröße größer als 74 µm bei 10-15% und eine Partikelgröße größer als 10µm bei 70-75% aufweist, welcher von der American Norit Company unter dem Handelsnamen NORIT-SX-ULTRA[®] verkauft wird, behandelt und dann zur endgültigen Ausfällung gebracht.

50 Zu der angereicherten Lösung wird eine gesättigte Lösung von Kaliumacetat in Wasser zugesetzt, bis ein pH-Wert von 8,5 erreicht ist. Dann wird die Lösung mit dem gleichen Volumen Methanol verdünnt und in 40 Volumsteile kalten Acetons (+5 °C) gegossen. Der weiße kristalline Niederschlag wird dann durch Filtration abgetrennt und im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet.

Es werden 350 g reines Kaliumclavulanat mit einer Stärke von 820 µg/mg (HPLC) entsprechend einer 55 Gesamtaktivität von 287 g (Ausbeute 45,5 %) erhalten.

Das auf diese Weise gewonnene Produkt entspricht der Qualität von USP XXII (vgl. Seite 316).

Verfahren zur Gewinnung von Streptomyces Clavuligerus var. FAC

Streptomyces Clavuligerus var. FAC wurde durch Genmanipulation von Streptomyces Clavuligerus Type Stamm ATCC (American Type Culture Collection) 27064 (Int. J. Syst. Bact. 21, 331, 1971) gewonnen.

Der Mikroorganismus wurde nach folgendem Verfahren erhalten:

Protoplasten von Streptomyces Clavuligerus wurden folgendermaßen erhalten: die Sporen von S. Clavuligerus wurden in Medium YEME (3 g/l Hefeextrakt, 3 g/l Malzextrakt, 5 g/l Pepton, 10 g/l Glucose, 340 g/l Saccharose, 1 g/l $MgCl_2$; Zusatz von 20 % Glycin-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 2 %) während 36 bis 40 Stunden bei 30 °C in einer alternierenden Schüttelvorrichtung gezüchtet.

Die Biomasse wird bei 3000 Upm 10 min zentrifugiert und das Pellet zweimal in 50 ml einer 10,2 %-igen Saccharose-Lösung gewaschen. Das endgültige Pellet wird in 4 ml Phosphatpuffer und 1 mg/ml Lysozym resuspendiert.

Die Suspension wird bei 30 °C 1 bis 1,5 Stunden inkubiert, bis das Mycel vollständig verdaut ist und nur Protoplasten vorliegen. Die Protoplasten werden filtriert und mit Phosphatpuffer gewaschen, um restliches Lysozym zu entfernen; schließlich werden sie in Puffer resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

Die Protoplasten wurden mit einem speziellen Vektor transformiert, der für diesen Zweck entwickelt wurde.

Es wurde die "Gewehrschuß (shotgun) -Klonierungsmethode" verwendet, um ein Fragment des ganzen Streptomyces Clavuligerus Genoms, das von dem Restriktionsenzym, wie etwa von BglI und Sac I, erzeugt wurde, zu gewinnen. Das verwendete Plasmid war PIJ 702, das aus Streptomyces Lividans erhalten wurde.

Die Auswahl dieses Plasmids beruhte auf dessen einfacher Isolierung und der Anwesenheit von Markern (Thiostrepton-Resistenz und insertionelle Inaktivierung).

Auf diese Weise wurden Vektoren durch Ligation des Plasmids PIJ 702 und des DNA-Fragments des Gesamtgenoms in der Größe von 5 kD bis 10 kD hergestellt.

Die Transformanten wurden in R5 Medium (100 g/l Saccharose, 5,1 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 g/l Casamino-säuren, 0,05 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,5 g/l L-Arginin-HCl, 1 ml Spurenelemente - Zn, Fe, Cu, Mg, Na_2BO_3 und Ammoniummolybdat - 20 g/l Agar) regeneriert und in einem Medium getestet, das 50 mg/ml Thiostrepton enthielt.

Die gut gewachsenen Kolonien werden selektiert und gemäß dem hierin beschriebenen Verfahren auf Clavulansäure-Produktion getestet.

Beispiel 1

Ausgehend von einer lyophilisierten Ampulle von Streptomyces Clavuligerus var. FAC wird Kolonieselektion durchgeführt, indem auf einem festen Medium mit der folgenden Zusammensetzung ausgestrichen wird:

Kohlenhydratquelle (Dextrin oder Dextrose)	10 g/l
Calciumcarbonat	2 g/l
Spurenelemente ($CoCl_2$, $FeSO_4$)	1 ml
Agar Agar	20 g/l

Nach der Inkubation der Platten bei einer konstanten Temperatur werden die typischen Kolonien ausgewählt. Typische Kolonien sind rund, erhaben und mit einem obenauf liegenden grünen Sporenrasen. Sie werden auf Schrägmedium aus dem gleichen festen Medium übertragen und 7 bis 10 Tage bei einer Temperatur von 26 °C inkubiert, bis der Sporenrasen gut gewachsen ist.

Die reifen Schrägkulturen werden in Flaschen unter Verwendung eines vegetativen Mediums mit der folgenden Zusammensetzung getestet:

Proteinquelle (Maismehl oder Erdnußmehl)	25 g/l
Kohlenhydratquelle (Maisstärke)	10 g/l
Kaliumphosphat	0,5 g/l
Sojabohnenöl	2 g/l

Das inokulierte Medium wird unter Rühren 45 bis 60 h inkubiert und dann aseptisch in ein Fermentationsmedium folgender Zusammensetzung übertragen:

Sojabohnenmehl (oder Erdnußmehl)	35 g/l
Dextrose	8 g/l
Kaliumphosphat	1 g/l
Spurenelemente (NiSO ₄ : CoSO ₄ , Lösung 1 %)	1 ml

Die Flaschen werden unter Rühren 3 bis 5 Tage bei konstanter Temperatur (25 °C) inkubiert und auf die Clavulansäure-Aktivität titriert. Die am besten produzierenden Kolonien werden dann auf einem festen Medium propagiert, um eine ausreichende Biomasse für die industrielle Produktion zu erhalten.

Die Sporensuspension der propagierten Kolonien wird in einen Samentank inokuliert, der ein steriles Medium der folgenden Zusammensetzung enthält:

Sojabohnenmehl (oder andere Proteinquellen)	50 g/l
Natriumphosphat	1 g/l
Dextrose (oder Dextrin)	40 g/l
Silikon-Antischaummittel	0,5 g/l

Andere Proteinquellen, die zufriedenstellende Ergebnisse liefern, sind Baumwollsaamenmehl oder Mais-mehl.

Ein industrieller Samentank entwickelt sich normalerweise in 45 h bei einer Temperatur von 25 °C bis 30 °C (vorzugsweise 26 °C) unter kontinuierlichem Rühren und unter Belüftung.

Sobald sich die Biomasse entwickelt hat, wird sie aseptisch in einen gerührten sterilen Fermenter übertragen, in dem die folgende typische Medienzusammensetzung vorliegt:

Sojabohnenmehl	35 g/l
Dextrin	35 g/l
Triglyceride	25 g/l
Spurenelemente (Lösung 1 % von MgSO ₄ , FeSO ₄ , ZnSO ₄ , CuSO ₄)	1 ml

Die Fermentation wird 5 bis 7 Tage bei einer konstanten Temperatur von 24 °C bis 27 °C fortgesetzt und der pH-Wert wird durch Alkalizusatz auf einen Wert zwischen 6,8 und 7,0 eingestellt.

Während der Fermentation werden die Kohlenstoffquellen kontinuierlich zugesetzt, um die Produktion zu verbessern.

Das geeignetste Fermentationsgefäß ist ein üblicher aerober Fermenter, der mit Rührung und Belüftung ausgestattet ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung und Reinigung von Alkalimetallsalzen der Clavulansäure aus einer Fermentationsbrühe von *Streptomyces Clavuligerus*, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

A) einen Koagulationsschritt, der durch Zusatz eines Flockungsmittels aus der Gruppe Calciumchlorid, Kaliumferrocyanid, wasserlösliche kationische Polymere und organische Polyelektrolyte zu einer Fermentationsbrühe von *Streptomyces Clavuligerus* bei einer Temperatur von 0 °C bis +10 °C und bei einem pH-Wert von 4,0 bis 4,5 vorgenommen wird;

B) Ultrafiltration der oben erhaltenen, geklärten Fermentationsbrühe von *Streptomyces Clavuligerus*, die auf einer Temperatur zwischen 0 °C und +10 °C und bei einem pH-Wert zwischen 6,0 und 6,5 gehalten wird, durch eine Ultrafiltrationsmembran, die einen Cut-off zwischen 30.000 und 100.000 Dalton hat;

C) Entfärbung des oben erhaltenen Ultrafiltrats durch Laufenlassen desselben durch eine Säule mit einem polymeren Acrylesterharz bei einer Temperatur von 0 °C bis +10 °C;

D) Einengung der flüssigen Phase aus Stufe C) mit Hilfe der reversen Osmose durch eine Membran, die einen Cut-off von 750 bis 500 Dalton hat, bei einer Temperatur von 0 °C bis +10 °C und einem pH-Wert von 6,0 bis 6,5;

E) Entfärbung der eingengten Flüssigkeit mit säuregewaschenen, dampfaktivierter Kohle bei einem pH-Wert von 6,0 bis 6,5 und einer Temperatur von 0 °C bis +10 °C;

F) Salzbildung der Clavulansäure durch Zusatz einer wässrigen Lösung eines Alkalimetallsalzes zu der oben erhaltenen angereicherten wässrigen Lösung;

G) Ausfällung des Alkalimetallsalzes der Clavulansäure aus der oben erhaltenen wässrigen Lösung durch Zusatz eines niedrigen Alkohols aus der Gruppe Methanol und Ethanol und anschließenden Zusatz eines aus der Gruppe Isopropanol und Aceton ausgewählten Lösungsmittels zu der dort erhaltenen hydroalkoholischen Phase bei einer Temperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ bis $+15^{\circ}\text{C}$.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Schritte A-E bei einer Temperatur von $+2^{\circ}\text{C}$ bis $+5^{\circ}\text{C}$ durchgeführt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentationsbrühe von dem Stamm *Streptomyces Clavuligerus* var. FAC erhalten wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Koagulationsmittel ein wasserlösliches kationisches Polymer ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Ultrafiltrationsmembranen einen Cut-off von 30.000 bis 40.000 haben und aus Celluloseacetat oder aus Polysulfon bestehen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Ultrafiltrationsmembran eine Polysulfon-Membran mit einem Cut-off von 35.000 Dalton und die Membran der reversen Osmose eine Celluloseacetat-Membran mit einem Cut-off von 500 Dalton ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Ultrafiltration nach der Diafiltrationstechnik ausgeführt wird, wobei dieselbe Membran verwendet und dem Retentat entionisiertes Wasser bei gleicher Filtrationsrate zugesetzt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zuerst $1/3$ bis $2/3$ einer Fermentationsbrühe mit einer Stärke von $4,0\text{ g/l}$ bis $4,5\text{ g/l}$ durch die ausgewählte Membran ultrafiltriert, dann der verbleibende Teil durch dieselbe Membran diafiltriert wird, wobei die Diafiltration abgebrochen wird, wenn der Verdünnungsfaktor von $1:2,1$ bis $1:2,4$ erreicht ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Acrylesterharz ein Porenvolumen von 55% , einen mittleren Porendurchmesser von $80 \cdot 10^{-4}\text{ }\mu\text{m}$ und eine Maschengröße von $1,27$ bis $0,508\text{ mm}$ aufweist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die reverse Osmose abgebrochen wird, wenn die Stärke der wässrigen Lösung bei 10 g/l bis 30 g/l liegt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß von der aktivierten Kohle 10% bis 15% eine Teilchengröße von mehr als $74\text{ }\mu\text{m}$ und 70% bis 75% eine Teilchengröße von mehr als $10\text{ }\mu\text{m}$ aufweisen und daß die Kohle eine Molasse-Erfärbungszahl von 175 und eine Oberfläche von $1150\text{ m}^2/\text{g}$ hat.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige Lösung, die dem Ausfällungsschritt unterworfen werden soll, eine Clavulansäure-Konzentration von 15 g/l bis 20 g/l hat.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Clavulansäure-Konzentration 17 g/l beträgt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Alkalimetallsalze anorganische oder organische Salze von Natrium, Kalium oder Lithium sind und ausgewählt werden aus der Gruppe der Carbonate, Bicarbonate, Propionate und 2-Ethylhexanoate.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Alkalimetallsalz Kaliumacetat ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Alkalimetallsalz in einer Menge von 1,3 bis 2,0 Äquivalenten in bezug auf die entsprechende Säure eingesetzt wird; daß der niedrige Alkohol in einer Menge von 0,5 bis 1,5 Volumteilen pro Volumteil der angereicherten wässrigen Lösung verwendet wird; daß Isopropanol in Mengen von 0,5 bis 3 Volumteilen und Aceton in Mengen von 15 bis 50 Volumteilen, bezogen auf die hydroalkoholische Phase, eingesetzt werden.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherte wässrige Lösung das Kaliumsalz der Clavulansäure in einer Menge von 15 g/l bis 20 g/l, ausgedrückt als Clavulansäure-Stärke, enthält, daß 1 Volumteil Methanol verwendet wird, daß das organische Lösungsmittel Aceton ist und in einer Menge von 40 Volumteilen, bezogen auf die hydroalkoholische Phase, eingesetzt wird und daß die Ausfällung bei +5 °C durchgeführt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die zu reinigende Fermentationsbrühe eine Stärke von 3,5 g/l bis 4,5 g/l aufweist, daß das Koagulationsmittel ein wasserlösliches kationisches Polymer ist und in einer Menge von 1 % eingesetzt wird und daß der pH-Wert während der Koagulation der Brühe auf 4,2 gehalten und durch Zusatz einer organischen Säure aus der Gruppe Propionsäure, Essigsäure und Zitronensäure kontrolliert wird.
19. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das wasserlösliche kationische Polymer ein kationisches Flockungsmittel mit einem spezifischen Gewicht bei 20 °C von 1,14 bis 1,18 kg/dm³, einem Titer von 29 bis 31%, einer Brookfield-Viskosität bei 25 °C von 200 bis 500 cps, einem pH von 5 bis 8, einer völligen Löslichkeit in Wasser und einem Gefrierpunkt von -18 (+/-3) °C ist.
20. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Acrylester ein Porenvolumen von 55%, eine echte Naßdichte von 1,05 g/ml, eine Oberflächenfläche von 450 m²/g, einen mittleren Porendurchmesser von 80 · 10⁻⁴ µm, eine Skelettdichte von 1,24 g/ml, eine Maschengröße entsprechend Öffnungen von 1,27 bis 0,508 mm und einen schwach polaren Charakter aufweist.
21. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der aktivierte Kohlenstoff ein säuregewaschener, dampfaktivierter Kohlenstoff ist, der eine Methylenblau-Adsorption von mindestens 20 g/100g, einen maximalen Feuchtigkeitsgehalt bei Verpacken von 10%, einen maximalen Aschegehalt von 8%, einen säurelöslichen Inhalt von maximal 1%, einen Calciumgehalt von maximal 200 ppm, einen Eisengehalt von maximal 200 ppm, einen bevorzugten Aschegehalt von 5%, einen wasserlöslichen Inhalt von 0,3%, einen pH-Wert des Wasserextrakts von 6 bis 8, eine Packungsschüttdichte von 0,290 g/ml, eine Partikelgröße größer als 74 µm bei 10-15% und eine Partikelgröße größer als 10 µm bei 70-75% aufweist.

PTO 99-0185

CY=AT DATE=19960325 KIND=B
PN=400846

PROCEDURE TO OBTAIN AND PURIFY ALKALI METAL SALTS OF CLAVULANIC ACID
[Verfahren zur Gewinnung und Reinigung von Alkalimetallsalzen der
Clavulansäure]

Eugenio Tisselli Gualtieri

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. November 1998

Translated by: Diplomatic Language Services, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(19): AT
DOCUMENT NUMBER	(11): 400846
DOCUMENT KIND	(12): B (13):
PUBLICATION DATE	(43):
PUBLICATION DATE	(45): 19960325
APPLICATION NUMBER	(21): 405/94
APPLICATION DATE	(22): 19940225
ADDITION TO	(61):
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51): C12P 17/18
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):
PRIORITY COUNTRY	(33):
PRIORITY NUMBER	(31):
PRIORITY DATE	(32):
INVENTOR	(72): TISSELLI GUALTIERI, EUGENIO
APPLICANT	(71):
TITLE	(54): PROCEDURE TO OBTAIN AND PURIFY ALKALI METAL SALTS OF CLAVULANIC ACID
FOREIGN TITLE	[54A]: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG UND REINIGUNG VON ALKALIMETALLSALZEN DER CLAVULANSÄURE

The present invention concerns a new procedure to obtain clavulanic acid in the form of its alkali metal salts, especially potassium salt, directly from a fermentation broth.

Clavulanic acid, which is also known as (2R,5R,Z)-3-(2-hydroxyethylidene)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo-2,3,0-heptane-2-carboxylic acid, is a naturally occurring, wide-spectrum antibiotic of average efficacy and was first isolated from strains of *Streptomyces clavuligerus* (GB PS 1 508 977).

The importance of clavulanic acid is not so much its antibiotic efficacy but rather its ability to inhibit beta-lactamase and hence increase the effectiveness of penicillin and cephalosporin against beta-lactamase-producing bacteria.

Clavulanic acid is now used in human medicine with penicillins such as amoxicillin (Augmentin®, Stacillin®) and ticarcillin (Betabactyl®, Timentin®).

Despite the fact that different fractionation procedures have been described for the purification of clavulanic acid, it is difficult to remove it in pure form from the complex mixture of products that accompanies it. Clavulanic acid is present in the fermentation broths of *Streptomyces clavuligerus* with numerous undesirable components such as proteins, enzymes, and other beta-lactam antibiotics, especially beta-lactam carboxylic acid, which has similar chemical-physical behavior.

Up to now, numerous efforts have been made to isolate clavulanic acid in a highly purified form, particularly by means of its salts such

*Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

as its lithium salt (GB PS 1 543 563) and its tert.-butylamine salt (US PS 4 647 659).

All of these prior-art methods have disadvantages since they generally only provide low yields or products with an unsatisfactory purity, and they are often very involved. In addition, these procedures do not permit the direct preparation of the potassium salt of clavulanic acid that is a component of different commercially available therapeutic compositions since its preparation in pure form requires the transformation of the lithium salt or tert.-butyl amine salt using additional steps of ion replacement.

A new, surprisingly advantageous procedure was found to obtain and purify clavulanic acid from fermentation broths of *Streptomyces clavuligerus* in the form of highly pure alkali metal salts.

The procedure to prepare highly pure alkali metal salts of clavulanic acid comprises the following steps:

A) a coagulation step that is carried out by adding highly pure flocculant from the group of calcium chloride, potassium ferrocyanide, water-soluble cationic polymers, and organic polyelectrolytes to a fermentation broth of *Streptomyces clavuligerus* at a temperature of 0-10°C and a pH of 4.0-4.5;

B) ultrafiltration of the above-obtained, clarified fermentation broth of *Streptomyces clavuligerus* held at a temperature of 0-10°C and a pH of 6.0-6.5 through an ultrafiltration membrane that has a cut-off of 30,000-100,000 Dalton;

C) decoloration of the above-obtained ultrafiltrate by letting it run through a column with a polymer acrylic ester resin at a temperature

of 0-10°C;

D) concentration of the liquid phase from step C) using reversible osmosis through a membrane that has a cut-off of 750-500 Dalton at a temperature of 0-10°C and a pH of 6.0-6.5;

E) decoloration of the concentrated liquid with acid-washed, vapor-active carbon at a pH of 6.0-6.5 and a temperature of 0-10°C;

F) formation of clavulanic acid salt by adding an aqueous solution of an alkali metal salt to the above-obtained enriched aqueous solution;

G) precipitation of the alkali metal salt of the clavulanic acid from the above-obtained aqueous solution by adding a low alcohol from the group of methanol and ethanol and then adding a solvent selected from the group of isopropanol and acetone to the obtained hydroalcoholic phase at a temperature of 5-15°C.

This process represents a particular selection of purification steps that allows clavulanic acid alkali metal salts at the quality level of USP XXII to be obtained. The process is simpler, more practical, and faster than the state-of-the-art purification procedure.

The use of selected flocculants, ultrafiltration membranes with a specific cut-off, and special decoloration materials allows an extremely purified solution to be obtained that is particularly suitable for the following precipitation step.

To the best of our knowledge, ultrafiltration membranes with a cut-off of 30,000 to 100,000 have never been used to purify clavulanic acid.

The effectiveness of the precipitation step in separating clavulanic acid alkali metal salts from the undesired impurities is related to the use of specific solvent mixtures that allow the cited

salts to be precipitated in a very pure form while the rubber-like byproducts are kept in solution.

The alkali metal salts of clavulanic acid precipitated in this manner are highly crystallized, white solids.

This purification method was used successfully particularly with fermentation broths obtained from the strain *Streptomyces clavuligerus* var. FAC described in Examples 2 and 3.

Starting with *Streptomyces clavuligerus*, type strain ATCC 27064 and using familiar gene manipulation procedures, the transformed strain *Streptomyces clavuligerus* var. FAC was obtained that has an unexpectedly strong capacity to reproduce in comparison to the original strain (see Example 2).

Clavulanic acid from *Streptomyces clavuligerus* var. FAC was produced by breeding it in the presence of assimilatable sources of carbon, nitrogen, and mineral salts and possibly triglycerides. The strain is preferably bred under aerobic conditions at a temperature of 20-37°C and especially 20-30°C under agitation.

Preferred protein sources are corn flour, peanut flour, soybean flour, and cottonseed flour. Particularly preferable is a special defatted cottonseed flour. Preferred sources of carbon are dextrin, dextrose, and cornstarch. The amount of protein source, carbon source, and triglycerides in the culture media is generally 1-10% and usually 2-5%.

Mineral acids are usually added to the culture medium, especially potassium, calcium, and sodium salts such as carbonates and phosphates.

Trace elements in the form of inorganic salts of Co, Fe, Mg, Ni,

Zn, and Cu (sulfates and chlorides) can also be added to the culture medium.

A foam-preventing agent can be added if necessary to prevent excess formation of foam.

Streptomyces clavuligerus FAC is preferably grown under aerobic conditions while stirring at a temperature of 24-27°C and a pH of 6.8-7.0 in the presence of a medium that contains a protein source from the group of soybean flour, peanut flour, and cottonseed flour, a carbon source from the group of dextrin, dextrose, and cornstarch, triglycerides, and trace elements from the group of inorganic salts of Fe, Mg, Zn, and Cu.

During fermentation, the pH is controlled by adding alkali, and the carbon source is added continually to improve production.

The fermentation step is generally preceded by a few growth steps. In particular, *Streptomyces clavuligerus* var. FAC is grown according to the following steps:

- a) a spore suspension of *Streptomyces clavuligerus* var. FAC is created;
- b) the culture is inoculated in a suitable seed tank;
- c) the mature seed tank culture is transferred to a ventilated and stirred fermenter in which the culture undergoes the above-described fermentation step.

The spore suspension is preferably created by growing *Streptomyces clavuligerus* var. FAC on a solid agar medium containing a carbon source (dextrin or dextrose), a calcium salt as a mineral salt, and Co and Fe salts as trace elements. The colonies that produce the most are then

selected after growing in a vegetative medium that contains a protein source from the group of corn flour and peanut flour, corn starch as a carbon source, and potassium salt as a mineral salt, and then further growing in a fermentation medium that contains soybean flour or peanut flour as the protein source, dextrose as a carbon source, a potassium salt as the mineral salt, and Ni and Co salts as trace elements. The colonies that reproduce the best are then grown on a solid medium.

The growth in the seed tank is in a medium that contains soybean flour, cottonseed flour, and corn flour as a protein source, dextrose or dextrin as the carbon source, and a sodium salt as the mineral salt.

All of the above-cited growth steps are carried out at temperatures of 20-37°C and preferably 25-30°C under aerobic conditions, and under agitation when working with a liquid medium.

Usually the fermentation broth to be purified has a nearly neutral or slightly acidic pH that lies between 6.0 and 7.0, and the strength (amount of clavulanic acid per liter broth) is 3.5 g/l to 4.5 g/l and preferably 4.0 g/l to 4.5 g/l.

The strength was measured by determining the clavulanic acid content by HPLC according to US XXII (p. 316).

In one preferred process, steps A to E are carried out at a temperature of 2-5°C.

Before the ultrafiltration step, the fermentation broth is clarified by denaturing and coagulating the contained proteins. The coagulation step allows the finely distributed solid particles suspended in the fermentation broth to clump, and the soluble polypeptides are also separated.

A highly purified fermentation broth is obtained using the coagulation step according to the invention. The coagulant is generally used at amounts of 0.5-2% (weight/volume) in reference to the volume of fermentation broth. A preferred coagulant (usually comprising 1%) is a coagulating, water-soluble cationic polymer, especially a liquid, cationic flocculant with a specific weight at 20°C of 1.14 to 1.18 kg/dm³, a titer of 29-31%, a Brookfield viscosity at 25°C of 200-500 cps, a pH of 5-8, complete solubility in water, and a freezing point of -18 (+/-3)°C.

The polyelectrolyte is, e.g., a water-soluble cationic polymer with a specific weight at 20°C of 1.14 to 1.18 kg/dm³, a titer of 29-31%, a Brookfield viscosity at 25°C of 200-500 cps, a pH of 5-8, complete solubility in water, and a freezing point of -18 (+/-3)°C.

The pH during coagulation is adjusted by adding an organic acid such as propionic acid, acetic acid, or citric acid. The preferred pH is 4.2.

After coagulation, the precipitated material is then separated by conventional procedures such as filtration.

The ultrafiltration step of the invention is especially effective in purifying the fermentation broth. In ultrafiltration, suspended solids are removed and (which is more important) some water-soluble molecules with a high molecular weight (sugars and soluble peptides that are present as nutrients in the culture media of *Streptomyces clavuligerus*, mycelium proteins) that can have a negative influence during the following purification step.

During ultrafiltration, the pH is held to the predetermined values

by adding a base, usually an aqueous solution of sodium hydroxide that has been previously cooled to the selected temperature.

Ultrafiltration membranes that are particularly good to use in the process according to the invention have a cut-off of 30,000-40,000 and are made from cellulose acetate or polysulfone. Polysulfone is preferable. Polysulfone membranes that have a cut-off of 35,000 Dalton are particularly preferable.

The ultrafiltration is carried out using diafiltration, a special ultrafiltration technique where the permeable solids are further extracted by adding water to the retentate. In particular, some of the liquid (ca. 1/3-2/3) is ultrafiltered through the selected membrane, and the remaining part is diafiltered through the same membrane by adding deionized water at the same filtration rate to the retentate.

The diafiltration is usually terminated when the dilution factor is 1:1.2 to 1:2.4, which corresponds to a diafiltered liquid strength of ca. 1.2 g/l to 1.5 g/l, starting with a fermentation broth with a strength of 4.0 to 4.5.

Reverse osmosis is a familiar process (that, e.g., can be used to desalinate water). It is used here as a mild and selective concentration method to increase the concentration of the clavulanic acid in the aqueous phase and achieve the best value for the subsequent precipitation step. During reverse osmosis, the water is forced to leave the solution through a semipermeable membrane through which dissolved material cannot pass, and a corresponding pressure is applied to the surface of the aqueous solution.

In this procedure, a semipermeable membrane is used that does not

let the clavulanic acid pass. A series of different materials can be used when their cut-off lies in the selected range.

Membranes made of cellulose acetate with a cut-off of 500 Dalton are preferably used.

Reverse osmosis is generally terminated when the concentrated solution has reached the desired clavulanic acid concentration for the following precipitation step, i.e., a strength of 10 g/l to 30 g/l, and preferably 15 g/l to 20 g/l.

Pressures of 30 bar to 40 bar (corresponding to $3 \cdot 10^6$ Pa to $4 \cdot 10^6$ Pa) are generally required.

The acrylic ester resin used in step C is preferably a resin with a pore volume of 55%, an average pore diameter of $80 \cdot 10^{-4}$ μm , and a mesh size corresponding to openings of 1.27 to 0.508 mm (20-50 openings every 25.4 mm) corresponding to the mesh width, e.g., an acrylic ester polymer adsorbent that has a pore volume of 55%, a true wet density of 1.05 g/ml, a surface area of 450 m^2/g , an average pore diameter of $80 \cdot 10^{-4}$ μm , a skeletal density of 1.24 g/ml, a mesh size corresponding to openings of 1.27 to 0.508 mm, and a slightly polar character.

The activated charcoal used in step E is preferably an active charcoal of which 10-15% has a particle size of more than 74 μm , and 70-75% has a particle size of more than 10 μm . The Molasse decoloration number is below 200, and the surface is more than 1,000 m^2/g , and in particular, Molasse decoloration number is 175, and the surface is 1,150 m^2/g , such as an acid-washed, vapor-active carbon that has a methylene blue adsorption of at least 20 g/100 g, a maximum moisture content when packed of 10%, a maximum ash content of 8%, a maximum acid-soluble

content of 1%, a maximum calcium content of 200 ppm, a maximum iron content of 200 ppm, an ash content of 5%, a water-soluble content of 0.3%, a water extract pH of 6-8, a packing bulk density of 0.290 g/ml, a particle size greater than 74 μm of 10-15%, and a particle size greater than 10 μm of 70-75%.

The alkali metal salts can either be inorganic or organic salts of alkali metals such as sodium, potassium, and lithium. Carbonates and bicarbonates can be used as the inorganic salts. Propionates, acetates, and 2-ethyl hexanoates can be used as the organic salts.

In a preferred embodiment of the invention, potassium salts can be used (preferably potassium acetate), and the potassium clavulanate is precipitated in a particularly pure form. The amount of alkali metal salt is sufficient to form the salt of clavulanic acid, preferably at amounts of 1.3-2.0 equivalents in reference to the corresponding acid.

In general, to attain a greater percentage yield of clavulanic acid, it is preferable for the concentration of alkali metal salt of clavulanic acid in the aqueous solution to be adjusted between 10 g/l and 30 g/l (preferably 15 g/l-20 g/l and especially 17 g/l expressed as the strength of clavulanic acid) before adding the low alcohol.

To avoid excess dilution of the aqueous decolorized solutions in step E, the organic and inorganic alkali metal salts are usually added in the form of highly concentrated and even saturated solutions. For example, the alkali metal salt (e.g., when potassium acetate is used and the enriched aqueous solution contains clavulanic acid at an amount of 15 g/l-20 g/l) is added in the form of a saturated solution, and the amount of alkali metal salt is regulated by adjusting the pH to 8.0-8.5.

The amount of methanol and isopropanol or acetone that is used during the precipitation step is adjusted to optimize the amount and quality of the alkali metal salt of clavulanic acid to be obtained. Methanol is preferably used as the low alcohol.

Usually, 0.5-1.5 parts by volume of methanol are added for each part by volume of enriched aqueous solution, while the amount of added isopropanol ranges from 0.5-3 parts by volume. The amount of acetone is 15-50 parts by volume in reference to the hydroalcoholic phase.

When the enriched solution contains 15 g/l to 20 g/l potassium salt of clavulanic acid, it is preferable to use 1 part by volume of methanol, and the organic solvent acetone is used at an amount of 40 parts by volume in reference to the hydroalcoholic phase.

The preferred temperature during the precipitation step is 5°C.

The precipitated alkali metal clavulanates can be removed in a conventional manner such as filtration, and can then be dried in a vacuum (e.g., generated by a water jet pump) at RT.

This procedure produces very good yields of crystalline, highly purified alkali metal salts of clavulanic acid.

In comparison to prior-art procedures, this procedure is very advantageous considering the low number of process steps. The clavulanic acid or its salts do not have to be intermediately isolated. In addition, the purification process can be carried out with a relatively small amount of solvent and water, and concentration columns, which are very impractical, are dispensed with.

The present invention will now be explained with reference to the following, non-limiting example.

Example

150 l fermentation broth of *Streptomyces clavuligerus* (strength: 4.2 g/l, equivalent to an activity of 630 g) is cooled in a jacketed reactor to 5°C, the pH is adjusted with pure acetic acid to 4.2, and 1% of a liquid cationic flocculant with a specific weight at 20°C of 1.14 to 1.18 kg/dm³, a titer of 29 to 31%, a Brookfield viscosity at 25°C of 200-500 cps, a pH of 5-8, complete solubility in water, and a freezing point of -18 (+/-3)°C (sold by Prodeco (Italy) under the trade name of Prodefloc®) are added to the paste. After 30 min., the stirrer is turned off and the flakes are removed by filtration through a sieve with openings of 0.127 mm.

The filtered liquid is subjected to an ultrafiltration process in which a polysulfone membrane is used with a cut-off of 35,000 Dalton.

As soon as approximately one-half of the volume has been filtered, diafiltration begins by adding deionized water at the same filtration rate. The filtration is terminated as soon as the dilution factor is 1:2.1 to 1:2.4, and 330 to 360 l ultrafiltrate has been obtained at a strength of 1.5 g/l (overall activity: 495 to 500 grams in the ultrafiltrate, corresponding to a 78% yield activity/activity of the filtered broth).

Ca. 60 l retentate is obtained that contains the mycelium proteins and byproducts.

During this procedure, the temperature is held at 5°C, and the pH is held at 6 to 6.5 with 5% sodium hydroxide cooled to 5°C.

The ultrafiltration broth cooled to 5°C is passed through the decoloration column, which contains 8 kg of an acrylic ester polymer

adsorbent that has a pore volume of 55%, a true wet density of 1.05 g/ml, a surface of 450 m²/g, an average pore diameter of $80 \cdot 10^{-4}$ μm, a skeletal density of 1.24 g/ml, a mesh width corresponding to openings of 1.27 to 0.508 mm, and a slightly polar character (which can be purchased by Rohm and Haas Co. under the trade name of Amberlite XAD7®), and is fed directly to reverse osmosis.

During this procedure, the temperature is held at 2-5°C and the pH at 6.2.

The equipment is a DDS model RO 30 (trademark of Danske Sukkerfabrikker, Denmark) with cellulose membranes with a cut-off of 500 Dalton.

The preparation is concentrated until the pressure has risen to 35 bar and the flow has fallen to one-fifth of the original flow.

20 l of the concentrated solution is obtained at a concentration of 17.5 g/l; this corresponds to 350 g activity (yield: 70% activity/activity of the filtered broth; overall yield: 55%).

The enriched solution is treated at 3°C and a pH of 6 in three steps with 1.5 kg decoloration carbon, an acid-washed, vapor-active carbon that has a methylene blue adsorption of at least 20 g/100 g, a maximum moisture content when packed of 10%, a maximum ash content of 8%, a maximum acid-soluble content of 1%, a maximum calcium content of 200 ppm, a maximum iron content of 200 ppm, an ash content of 5%, a water-soluble content of 0.3%, a water extract pH of 6-8, an overall packing bulk density of 0.290 g/ml, 10-15% particles greater than 74 μm, and 70-75% particles greater than 10 μm. The carbon can be obtained by the American Norit Company under the trade name of NORIT-SX-ULTRA®. The

solution then undergoes final precipitation.

A saturated solution of potassium acetate in water is added to the enriched solution until a pH of 8.5 is attained. Then the solution is diluted with an equivalent volume of methanol and poured into 40 parts by volume of cold acetone (5°C). The white crystalline precipitate is then removed by filtration and dried in a vacuum at RT.

350 g pure potassium clavulanate is obtained at a strength of 820 µg/mg (HPLC) corresponding to an overall activity of 287 g (yield: 45.5%).

The product obtained in this manner corresponds to the quality in USP XXII (see p. 316).

Process to Obtain *Streptomyces clavuligerus* var. FAC

Streptomyces clavuligerus var. FAC was obtained by gene manipulation of *Streptomyces clavuligerus*, type strain ATTC (American Type Culture Collection) 27064 (Int. J. Syst. Bact. 21, (1971) 331).

The microorganism was obtained using the following process:

Protoplasts of *Streptomyces clavuligerus* were obtained as follows: The spores of *S. clavuligerus* were cultivated in the medium YEME (3 g/l yeast extract, 3 g/l malt extract, 5 g/l peptone, 10 g/l glucose, 340 g/l saccharose, 1 g/l MgCl₂; 20% glycine solution is added up to a final concentration of 2%) for 36-40 h at 30°C in an reciprocating shaker.

The biomass was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min., and the pellet was washed twice in 50 ml of a 10.2% saccharose solution. The final pellet was resuspended in 4 ml phosphate buffer and 1 mg/ml lysozyme.

The suspension was incubated at 30°C for 1-1.5 h until the mycelium had been completely digested and only protoplasts were left. The protoplasts were filtered and washed with phosphate buffer to remove the residual lysozyme. Finally, the protoplasts were resuspended in a buffer and stored at -80°C.

The protoplasts were transformed into a special vector that was developed for this purpose.

The shotgun cloning method was used to obtain a fragment of the overall *S. clavuligerus* genome, which was produced from the restriction enzyme, such as BglI and Sac I. The plasmid was PLJ 702 that was obtained from *Streptomyces lividans*.

The selection of this plasmid was based on its ease of being isolated and the presence of markers (thiostreptone resistance and insertional inactivation).

In this manner, vectors were obtained by ligation of plasmid PLJ 702 and DNA fragments of the overall genome that were 5 kD to 10 kD.

The transformants were regenerated in R5 medium (100 g/l saccharose, 5.1 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l casamino acids, 0.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g/l L-arginine HCl, 1 ml trace elements--Zn, Fe, Cu, Mg, Na_2BO_4 , and ammonium molybdate--20 g/l agar) and tested in a medium that contained 50 mg/ml thiostreptone.

The well-washed colonies were selected and tested according to the procedure described in this document.

Example 1

Starting with a lyophilized ampule of *Streptomyces clavuligerus* var. FAC, colonies were selected by applying the following composition onto a solid medium:

Carbohydrate source (dextrin or dextrose)	10 g/l
Calcium carbonate	2 g/l
Trace elements (CoCl ₂ , FeSO ₄)	1 ml
Agar agar	20 g/l

After the dishes were incubated at a constant temperature, typical colonies were selected. Typical colonies are round, raised, and have a green spore lawn on top. They were transferred to a slanted medium consisting of the same solid medium and incubated for 7-10 days at 26°C until the spore lawn had grown well.

The mature slant cultures were tested in bottles using a vegetative medium with the following composition:

Protein source (corn flour or peanut flour)	25 g/l
Carbohydrate source (cornstarch)	10 g/l
Potassium phosphate	0.5 g/l
Soybean oil	2 g/l

The inoculated medium was incubated for 45-60 h under agitation and then aseptically transferred to a fermentation medium with the following composition:

Soybean flour (or peanut flour)	35 g/l
Dextrose	8 g/l
Potassium phosphate	1 g/l
Trace elements (NiSO ₄ , CoSO ₄ , 1% solution)	1 ml

The bottles were incubated under agitation for 3-5 days at a constant temperature (25°C) and titrated for clavulanic acid activity. The best-producing colonies were then propagated on a solid medium to obtain a sufficient biomass for industrial production.

The spore suspension of the propagated colonies was inoculated in a seed tank that contained a sterile medium with the following composition:

Soybean flour (or another protein source)	50 g/l
Sodium phosphate	1 g/l
Dextrose (or dextrin)	40 g/l
Silicone antifoaming agent	0.5 g/l

Other protein sources that provide satisfactory results are cottonseed flour or corn flour.

An industrial seed tank develops normally over 45 h at a temperature of 25-30°C (preferably 26°C) under continual agitation and ventilation.

As soon as the biomass developed, it was aseptically transferred to a stirred sterile fermenter that contains the following typical media

composition:

Soybean flour	35 g/l
Dextrin	35 g/l
Triglyceride	25 g/l
Trace elements (1% solution of MgSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4)	1 ml

The fermentation was continued for 5-7 days at a constant temperature of 24-27°C, and the pH was adjusted to 6.8-7.0 by adding alkali.

During fermentation, the carbon source was added continually to improve production.

The most suitable fermentation container is a conventional aerobic fermenter that has an agitator and ventilation.

Patent Claims

1. Process to obtain and purify the alkali metal salts of clavulanic acid from a fermentation broth, characterized by the following steps:

A) a coagulation step that is carried out by adding a flocculant from the group of calcium chloride, potassium ferrocyanide, water-soluble cationic polymers, and organic polyelectrolytes to a fermentation broth of *Streptomyces clavuligerus* at a temperature of 0-10°C and a pH of 4.0-4.5;

B) ultrafiltration of the above-obtained, clarified fermentation broth of *Streptomyces clavuligerus* that is held a temperature of 0-10°C

and a pH of 6.0-6.5 through an ultrafiltration membrane that has a cut-off of 30,000-100,000 Dalton;

C) decoloration of the above-obtained ultrafiltrate by letting it run through a column with a polymer acrylic ester resin at a temperature of 0-10°C;

D) concentration of the liquid phase from step C) using reverse osmosis through a membrane that has a cut-off of 750-500 Dalton at a temperature of 0-10°C and a pH of 6.0-6.5;

E) decoloration of the concentrated liquid with acid-washed, vapor-active carbon at a pH of 6.0-6.5 and a temperature of 0-10°C;

F) formation of clavulanic acid salt by adding an aqueous solution of an alkali metal salt to the above-obtained enriched aqueous solution;

G) precipitation of the alkali metal salt of the clavulanic acid from the above-obtained aqueous solution by adding a low alcohol from the group of methanol and ethanol and then adding a solvent selected from the group of isopropanol and acetone to the obtained hydroalcoholic phase at a temperature of 5-15°C.

2. Process according to Claim 1, characterized in that steps A-E are carried out at a temperature of 2-5°C.

3. Process according to Claim 1 or 2, characterized in that the fermentation broth is obtained by the strain *Streptomyces clavuligerus* var. FAC.

4. Process according to one of Claims 1-3, characterized in that the coagulant is a water-soluble cationic polymer.

5. Process according to one of Claims 1-4, characterized in that the ultrafiltration membranes have a cut-off of 30,000-40,000 [Dalton]

and consist of cellulose acetate or polysulfone.

6. Process according to one of Claims 1-5, characterized in that the ultrafiltration membrane is a polysulfone membrane with a cut-off of 35,000 Dalton, and the membrane for reverse osmosis is a cellulose acetate membrane with a cut-off of 500 Dalton.

7. Process according to one of Claims 1-6, characterized in that ultrafiltration is carried out by diafiltration, where the same membrane is used and deionized water is added to the retentate at the same filtration rate.

8. Process according to one of Claims 1-7, characterized in that first 1/3-2/3 of a fermentation broth at a strength of 4.0 g/l to 4.5 g/l is ultrafiltered through the selected membrane, then the remaining component is diafiltered through the same membrane, and diafiltration is terminated when a dilution factor of 1:2.1 to 1:2.4 is reached.

9. Process according to one of Claims 1-8, characterized in that the acrylic ester resin has a pore volume of 55%, an average pore diameter of $80 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}$, and a mesh width of 1.27 to 0.508 mm.

10. Process according to one of Claims 1-9, characterized in that reverse osmosis is terminated when the strength of the aqueous solution is 10 g/l to 30 g/l.

11. Process according to one of Claims 1-10, characterized in that 10%-15% of the activated carbon has a particle size of more than $74 \mu\text{m}$, and 70%-75% has a particle size of more than $10 \mu\text{m}$, and the carbon has a Molasse decoloration number of 175 and a surface of $1,150 \text{ m}^2/\text{g}$.

12. Process according to one of Claims 1-11, characterized in that the aqueous solution that is subjected to the precipitation step has a

clavulanic acid concentration of 15 g/l to 20 g/l.

13. Process according to Claim 12, characterized in that the clavulanic acid concentration is 17 g/l.

14. Process according to one of Claims 1-13, characterized in that the alkali metal salt is an inorganic or organic salt of sodium, potassium, or lithium and is selected from the group of carbonates, bicarbonates, propionates, and 2-ethylhexanoates.

15. Process according to one of Claims 1-14, characterized in that the alkali metal salt is potassium acetate.

16. Process according to one of Claims 1-15, characterized in that the amount of utilized alkali metal salt is 1.3-2.0 equivalents in reference to the corresponding acid; the amount of low alcohol is 0.5-1.5 parts by volume per part by volume of the enriched aqueous solution; the amount of isopropanol is 0.5-3 parts by volume; and the amount of acetone is 15-50 parts by volume in reference to the hydroalcoholic phase.

17. Process according to one of Claims 1-16, characterized in that the enriched aqueous solution contains 15 g/l to 20 g/l potassium salt of clavulanic acid expressed as the clavulanic acid strength; 1 part by volume of methanol is used; the organic solvent is acetone and is used at an amount of 40 parts by volume in reference to the hydroalcoholic phase; and the precipitation occurs at 5°C.

18. Process according to one of Claims 1-17, characterized in that the fermentation broth to be purified has a strength of 3.5-4.5 g/l; the coagulant is a water-soluble cationic polymer and is used at an amount of 1%; and the pH is held at 4.2 while coagulating the broth and is

controlled by adding an organic acid from the group of propionic acid, acetic acid, and citric acid.

19. Process according to Claim 4, characterized in that the water-soluble cationic polymer is a cationic flocculant with a specific weight at 20°C of 1.14-1.18 kg/dm³, a titer of 29-31%, a Brookfield viscosity at 25°C of 200-500 cps, a pH of 5-8, complete solubility in water, and a freezing point of -18 (+/-3)°C.

20. Process according to Claim 9, characterized in that the acrylic ester has a pore volume of 55%, a true wet density of 1.05 g/ml, a surface area of 450 m²/g, an average pore diameter of 80.10⁻⁴ μm, a skeletal density of 1.24 g/ml, a mesh size corresponding to openings of 1.27 to 0.508 mm, and a slightly polar character.

21. Process according to Claim 11, characterized in that the activated carbon is an acid-washed, vapor-active carbon that has a methylene blue adsorption of at least 20 g/100 g, a maximum moisture content when packed of 10%, a maximum ash content of 8%, a maximum acid-soluble content of 1%, a maximum calcium content of 200 ppm, a maximum iron content of 200 ppm, an ash content of 5%, a water-soluble content of 0.3%, a pH of the water extract of 6-8, a packing bulk density of 0.290 g/ml, a particle size greater than 74 μm at 10-15%, and a particle size greater than 10 μm at 70-75%.